

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-220100

(43) 公開日 平成8年(1996)8月30日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

G 0 1 N 33/564

G 0 1 N 33/564

B

33/53

33/53

N

// C 0 7 K 16/18

8517-4H1

C 0 7 K 16/18

審査請求 未請求 請求項の数7 O L (全 4 頁)

(21) 出願番号

特願平7-25727

(71) 出願人 000000217

エーザイ株式会社

東京都文京区小石川4丁目6番10号

(22) 出願日

平成7年(1995)2月14日

(72) 発明者 佐藤 俊孝

茨城県竜ヶ崎市長山8-6-7

(72) 発明者 藤松 順一

茨城県土浦市高津2-10-26

(72) 発明者 吉沢 政行

茨城県北相馬郡守谷町松が丘3-12-38

(54) 【発明の名称】 リウマチ因子測定試薬

(57) 【要約】

【目的】 ロット間のばらつきがなく、定量性に優れた新しいリウマチ因子測定試薬を提供する。

【構成】 リウマチ因子の補足用抗原として、従来用いられているIgGFc の代わりにIgGFc の一本鎖を用いることにより目的が達成されることを確認した。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒト免疫グロブリンG (IgG)のFc部分 (IgGfc)の一本鎖部分 (Fc/2) またはその誘導体をリウマチ因子捕捉用抗原として用いることを特徴とするリウマチ因子測定試薬。

【請求項2】 ヒト免疫グロブリンG (IgG)のFc部分 (IgGfc)の一本鎖部分 (Fc/2) またはその誘導体を、リウマチ因子捕捉用抗原として50%以上含むものを用いることを特徴とするリウマチ因子測定試薬。

【請求項3】 ヒト免疫グロブリンG (IgG)のFc部分 (IgGfc)の一本鎖部分 (Fc/2) が IgGfcを還元処理することにより得られる一本鎖部分である、請求項1または2記載のリウマチ因子測定試薬。

【請求項4】 ヒト免疫グロブリンG (IgG)のFc部分 (IgGfc)の一本鎖部分 (Fc/2) が IgGfcを還元処理することにより得られる一本鎖部分の部分構造を有しリウマチ因子と結合性を有する一本鎖である、請求項1または2記載のリウマチ因子測定試薬。

【請求項5】 ヒト免疫グロブリンG (IgG)のFc部分 (IgGfc)の一本鎖部分 (Fc/2) が IgGfcを還元アルキル化処理することにより得られる一本鎖部分である、請求項1または2記載のリウマチ因子測定試薬。

【請求項6】 リウマチ因子捕捉用抗原が固相に結合されていることを特徴とする、請求項1または2記載のリウマチ因子測定試薬。

【請求項7】 リウマチ因子のサンドイッチ測定法であって、ヒト免疫グロブリンG (IgG)のFc部分 (IgGfc)の一本鎖部分 (Fc/2) またはその誘導体を固相体に固定し、これと検体試料を反応させリウマチ因子を捕捉した後、リウマチ因子結合性物質または標識化リウマチ因子結合性物質と反応させ、リウマチ因子結合性物質の量を定量することに基づくリウマチ因子測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 ヒト免疫グロブリンG (IgG)のFc部分 (IgGfc)の一本鎖部分 (Fc/2) を用いるリウマチ因子測定試薬に関し、医薬の分野で利用される。

【0002】

【従来の技術】 慢性関節リウマチは多発性の慢性関節炎を特徴とする疾患で、我が国では数百万人の患者がいるとされているがその原因は特定されていない。リウマチ因子は IgGfc部分に対する自己抗体としてリウマチ患者の血清中に高頻度に出現し、リウマチ診断基準のひとつとして測定されている。このリウマチ因子には、免疫グロブリンの各クラスに属するものが知られているが、現在臨床的に測定されているのは IgG、IgM クラスのリウマチ因子であり、スクリーニング試薬として汎用されているものは、その測定手技上主に IgMクラスのリウマチ因子を用いている。また、IgGクラスのリウマチ因子は

2

重要視されつつある。このように現在では、クラス別リウマチ因子測定意義が研究されつつあり、クラス別リウマチ因子測定を可能にする方法も報告されている（特許公報 平 5-47781号）。リウマチ因子は IgGのFc部分に対する自己抗体ではあるが、変性 IgGよりも変性 IgGに対して強く反応することから、凝集法によるリウマチ因子測定試薬において、変性 IgGをリウマチ因子捕捉用抗原として用いるのが一般的である。しかしながら、変性後のIgGは不均一な性状をとることから、試薬ごとの測定値の変動および施設間差が大きいたことが問題となっている（臨床化学 第23巻補冊2号-第34回日本臨床化学会年会要旨集-64b 頁、1994年）。また、変性 IgGの代わりに IgGfc部分をリウマチ因子捕捉用抗原として用いた、サンドイッチ法による測定試薬の場合においても同じ問題が生じている。たとえば標準リウマチ因子陽性血清が用意されているとはいえ、臨床検査の場において試薬ロット間の変動のない安定な試薬の供給が望まれている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 試薬ロット間の変動のない安定な、さらに高感度なリウマチ因子測定試薬を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は、安定なリウマチ因子測定試薬の開発のために鋭意研究の結果、リウマチ因子捕捉用抗原に原因があることをつきとめた。サンドイッチ法による測定試薬において、捕捉用抗原として通常用いられる IgGfcは IgGをバブリンで酵素分解した後、CMおよび DEAE イオン交換カラムクロマトグラフィーで精製することによって得られる疎水性蛋白質である。これを SDS-PAGE で分析したところ、インタクトな IgGfcの分子量である 50,000の成分と 25,000の成分の二つが検出された。IgGfcは S-S結合による二本鎖構造を有しているが、この 25,000の成分は S-S結合解裂に基づく一本鎖 (Fc/2)であり、この一本鎖成分だけでも IgGfcの抗原性を有すること、いわゆるリウマチ因子と結合性を有することを本発明者らが初めて確認した。そこでこの二つの成分について、保存性、リウマチ因子との反応性について比較検討したところ、分子量 50,000の成分 (IgGfc)は凍結融解により白濁沈殿を生じ、保存前後でリウマチ因子との反応性が大きく異なることが認められた。これに対し、25,000の成分 (Fc/2)は凍結融解によって白濁沈殿は生じず、リウマチ因子との反応性に差が認められなかった。さらに IgGfcの代わりに Fc/2 をリウマチ因子測定系に使用すると試薬の安定化とともに感度も上昇することが確認され、本発明を完成するに至った。

【0005】 すなわち本発明は、ヒト体液中のリウマチ因子を測定する試薬及び方法であって、ヒト免疫グロブ

3

たはその誘導体を補足用抗原として用いることを特徴とするリウマチ因子測定試薬および測定方法に関する。Fc/2とは、IgGをバイン分解により得られるIgGfc部分をジチオスレイトールなど還元剤で処理することによってS-S結合を切断することにより得られる一本鎖を意味する。該一本鎖はそのままでも使用できるが、フリーのSH基を例えばアルキル化処理などにより保護されたものが好ましい。さらにFc/2は、バイン分解により得られるIgGfc部分の還元処理による一本鎖に限らず、たとえばヒンジ領域を含まない一本鎖部分などその部分構造を有する断片でリウマチ因子と反応性を有するものも本発明に含まれる。Fc/2の誘導体とは、SH基のアルキル化を含めて、該一本鎖あるいはその部分構造を有する断片のいずれの部位であれ、有機物質または無機物質を付加した誘導体でリウマチ因子と反応性を有するものすべてが含まれる。通常の調製法により調製したIgGfcは、酵素濃度、反応時間などの調製条件により多かれ少なかれFc/2が混在している。リウマチ因子捕捉用抗原として、本発明のFc/2を100%用いるのが好ましいが、従来用いられているIgGまたはIgGfcの中に約50%程度Fc/2が含まれればある程度の目的は達成することができる。Fc/2の割合が60%、70%と増加するほど好結果を与えることになる。本発明の安定試薬、高感度試薬を目的として、IgGfcの調製法を改変してFc/2の割合の多いIgGfcを使用すること、またはFc/2を添加して使用することなども本発明に含まれる。即ち本発明は、リウマチ因子捕捉用抗原として、Fc/2、その部分構造を有する断片またはそれらの誘導体を使用すること、すなわち一本鎖を使用することを特徴とするリウマチ因子測定試薬および方法である。

【0006】捕捉用抗原は操作の簡便性の観点から固相化されていることが好ましく、固相体は通常用いられているマイクロプレート、プラスチック粒子、磁気粒子、赤血球などいずれの固相体も利用することができ、本発明は固相体の種は問わない。粒子系の固相体を選択した場合、いわゆる凝集法によるリウマチ因子測定試薬として用いることができる。酵素免疫測定法などサンドイッチ法を用いる場合、通常、Fc/2は固相化し検体中リウマチ因子との第一反応物質として使用されるが、第二反応物質（場合により標識化）として使用することも可能であり、補足用抗原とは第一反応物質として用いることに限定されない。本発明のFc/2を使用してリウマチ因子を測定する方法は、例えば基本的には以下のようにして行えばよい。凝集法の場合、固相体粒子にFc/2を固定して検体試料と反応させ、凝集の度合いを判定すれば良い。酵素免疫測定法などサンドイッチ法の場合、まずに固相にFc/2を固定し、ここに生体試料を加えて反応させ洗浄後、酵素標識羊抗ヒト免疫グロブリン抗体のF(ab')

4

ンドイッチ法に基づく本発明試薬は、Fc/2を必須の構成要素とし、固相体、標準抗原、羊抗ヒト免疫グロブリン抗体のF(ab')₂（酵素標識）、酵素基質よりなる組み合わせたセットである。測定の実施の便益のために適当な抗原希釈液、反応希釈液、基質溶解液、反応停止液などがセット中に添付されることは自由である。なお、このサンドイッチ法による測定系において、第二反応物質として羊抗ヒト免疫グロブリン抗体を含めリウマチ因子と反応性を有する物質であればいずれも使用することができ、とくに限定されない。また第二反応物質を標識して使用する場合、標識物質として酵素、色素、金属、発光物質などいずれも使用することができ、本発明を限定するものではない。また本発明はヒトに限らず各種動物の場合にも応用することができる。

【0007】IgGfcは、ポーターの原法（Porter, R., Biochem. J., 73, 119, 1959）に準じて、IgGを中性pHにおいてバイン限定分解を行う常法により調製することができる。例えば、IgGを2-メルカプトエタノール含有リン酸緩衝液中（pH 7.5, EDTA含有）N₂通気下バインにて分解した後、CM-セルロースクロマトグラフィーおよびDEAE-セルロースクロマトグラフィーにより調製することができる（医化学実験法講座4巻 p100, 特公平5-47781号）。またヒトIgGfcは試薬として購入することもできる（オルガノンテクニカ社）。Fc/2は、IgGfcのS-S結合をジチオスレイトールなどの還元剤による通常の切断法により調製することができる。SH基のアルキル化はたとえばヨードアセトアミドなどを用いる常法により調製することができる。誘導体として、たとえば固相との結合性を高めるために、リジンアミノ酸、ペプチドを付加することができる。ヒンジ領域を含まないFc/2は内海らの方法により調製することができる（Utumi, S., Biochem. J., 112, 343, 1969）。第二反応試薬として羊抗ヒトIgGfd（FabのH鎖部分）抗体のF(ab')₂（アルカリホスファターゼ標識）を用いて、リウマチ因子捕捉用抗原の種類を変えてリウマチ因子測定系を検討した結果、IgGfcよりもFc/2を用いた場合の方が希釈直線性に優れ、リウマチ因子の変動を鋭敏に捕らえることが判明した。Fc/2は凍結融解により、リウマチ因子との反応性にまったく変化が認められないことから、安定な状態で長期保存が可能となり、性能の均一な捕捉用抗原（Fc/2）の供給ができ、試薬の安定性、定量性の向上をもたらしたものである。

【0008】

【実施例】以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されない。

【0009】実施例1. ヒトIgGfcの還元およびアルキル化Fc/2の調製

ヒトIgGをバイン分解して得られるIgGfcは試薬として

量のジチオスレイトールを加えて、37℃で一時間還元処理した。アルキル化 Fc/2 は、還元処理液に直接、終濃度が40mMになるようにヨードアセトアミドを加え、遮光下、室温で20分間処理し、還元処理により生じた遊離のSH基を保護した。ヨードアセトアミド処理した溶液は、精製水で10倍希釈した後遮光下4℃で精製水に対して透析した。このようにして調製された還元アルキル化Fc/2をSDS PAGE で分析したところ、分子量 25,000 の位置に目的とする蛋白質が泳動された。

【0010】実施例2. 凍結融解前後のIgGFc とFc/2の反応性の比較

凍結融解前後のIgGFc またはFc/2をマイクロプレートに固相化し、リウマチ患者血清を検体試料としてこれに添加反応させ洗浄後、羊抗ヒト IgGFc抗体の F(ab')₂ (アルカリホスファターゼ標識) を反応させた。洗浄後、酵素基質P-ニトロフェノールフォスフェートを添加し37℃30分反応後、405nm の吸光度を測定した。その結果図1及び2に示されるごとく、アルキル化Fc/2では凍結融解

前後で反応性に差が認められず(図1、相関性 $r=0.94$)、一方IgGFc はかなりの反応性の変化が認められた(図2、相関性 $r=0.62$)。

【0011】実施例3. IgGFcと Fc/2 のリウマチ因子定量性の比較

系列希釈したリウマチ患者血清を検体として、IgGFcとアルキル化 Fc/2 に対する反応性を実施例2と同じ方法で比較した。その結果、図3に示されるように、IgGFcと比較してアルキル化 Fc/2 は直線性に優れ、精度の高い測定を可能とした。

【0012】

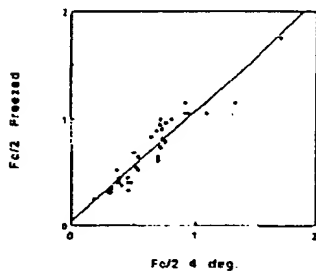
【図面の簡単な説明】

【図1】凍結融解前後のFc/2とリウマチ因子との反応性

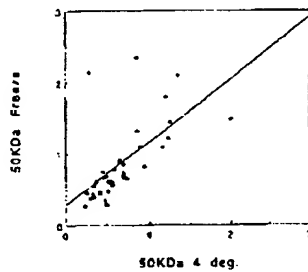
【図2】凍結融解前後のIgGFc とリウマチ因子との反応性

【図3】 IgGFcとアルキル化 Fc/2 のリウマチ因子定量性

【図1】



【図2】



【図3】

